Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. H. E. Bock

Der Desoxyribonukleinsäuregehalt in den kernhaltigen Vorstufen roter Blutkörperchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hans-Georg Pouillon

aus Klosterhof

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0013

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. H. E. Bock

Der Desoxyribonukleinsäuregehalt in den kernhaltigen Vorstufen roter Blutkörperchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hans-Georg Pouillon

aus Klosterhof

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. J. Hirschmann
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Hinrichsen

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	Einleitung	3
II.	Fragestellung	4
III.	Methodik	5
IV.	Fallbesprechung	7
V.	Ergebnisse	1o
VI.	Diskussion	16
VII.	Zusammenfassung	27
VIII.	Literatur	29

E I N L E I T U N G

Nach den Vorstellungen der meisten Autoren (s. bei SCHULTEN,1) entwickeln sich die roten Blutkörperchen aus kernhaltigen Vorstufen (im folgenden Erythroblasten genannt) in fünf Reifungsstufen (Generationen).Jede Vorstufe ist von der vorangehenden durch eine Mitose getrennt. Für die Unterscheidung der einzelnen Stufen ist nach LEIBETSEDER (2) und WEICKER (3) die Kerngröße ein brauchbares Maß. WEICKER bezeichnet in Anlehnung an JACOBJ (4) den Proerythroblasten als K_2-Zelle und die verschiedenen Erythroblasten als K_1-, $K_{1/2}$-, $K_{1/4}$- und $K_{1/8}$-Zellen. Diese Zellkerngrößenklassen lassen sich jedoch nicht streng mit den morphologischen Merkmalen zur Deckung bringen (SCHULTEN,1); denn neben der Erythroblastengröße ist die Zytoplasmaanfärbung ein weiteres wichtiges Reifekriterium zur Differenzierung der Vorstufen roter Blutkörperchen. Nach der Pappenheim-Färbung lassen sich Erythroblasten mit basophilem, polychromatischem und oxyphilem Zytoplasma unterscheiden, je nach dem anwachsenden Hämoglobingehalt (AMBS,5).

In den Zellkernen bilden die Desoxyribonukleinsäuren (DNS) einen wesentlichen Bestandteil der genetischen Substanz der Chromosomen. Die DNS läßt sich mit der Feulgenfärbung- (FEULGEN und ROSSENBECK,6) quantitativ anfärben. Nach Feulgenfärbung erlaubt dann eine Absorptionsmessung im monochromatischen Licht den relativen DNS-Gehalt im einzelnen Zellkern zu bestimmen.

Da die jüngsten Erythroblastenvorstufen die größten Zellkerne aufweisen, andererseits aber das Kernvolumen nach jeder Generationszeit halbiert wird (WEICKER,7), und schließlich die Endglieder dieser Entwicklungskette kernlos sind, vermutet WEICKER (7), "daß die DNS-Menge (nach jeder Kernteilung) halbiert bleibt - wie das Kernvolumen auch."

II. F R A G E S T E L L U N G

Das Anliegen der hier vorgelegten experimentellen Untersuchung ist die Bestimmung der DNS-Menge in den verschiedenen Erythroblastenkernen. Es soll festgestellt werden, welche DNS-Menge den morphologisch und karyometrisch charakterisierten Erythroblasten zuzuordnen ist und welche Veränderung die DNS-Beladung der Kerne in den verschiedenen Erythroblastengenerationen erfährt. Mithilfe der Kombination zytometrischer Bestimmung und photometrischer Absorptionsmessung soll ein Einblick in eine normale Erythroblastenpopulation gewonnen werden.

Von Interesse ist insbesondere eine Antwort auf die Frage, inwieweit die von WEICKER postulierte Volumenhalbierung und DNS-Halbierung in den verschiedenen Reifungsstufen der Erythropoese durch gleichzeitige Kerngrößenbestimmung und Messung des relativen DNS-Gehaltes in demselben Zellkern gestützt werden kann.

III. M E T H O D I K

Für die vorliegenden Untersuchungen führten wir zytophotometrische Messungen des relativen DNS-Gehaltes an insgesamt 5000 Erythroblasten aus dem Sternalmark eines hämatologisch gesunden Erwachsenen durch (s. Fallbesprechung).

Mithilfe der Feulgenfärbung (FEULGEN u.ROSSENBECK,6) läßt sich die DNS spezifisch anfärben. Nach FEULGEN und ROSSENBECK ist grundlegend für die Feulgen-Reaktion,daß schwache Säuren die Purin-Glykosid-Verbindung im DNS-Molekül hydrolytisch aufspalten, sodaß Aldehyde freigesetzt werden. Diese Aldehyde reagieren mit farbloser Fuchsin-Schwefel-Säure (SCHIFFsches Reagenz) und ergeben eine gefärbte Verbindung (LEUCHTENBERGER,19).

1. Technik der Feulgenfärbung

Die luftgetrocknet aufbewahrten Knochenmarksausstriche (30 Ausstriche eines hämatologisch gesunden Erwachsenen) werden für 10 Minuten in 70% Alkohol fixiert. Nach exakter 12minütiger (Stoppuhr) Salzsäurehydrolyse bei 60 Grad C erfolgt schnelles Einstellen der Präparate in SCHIFFsches Reagenz für 1 Stunde, anschließend dreimal 10 Minuten Waschen in einer Spülflüssigkeit, die in folgender Weise frisch hergestellt wird: zu 10 ml nHCl fügt man 0,5 g Kaliummetabisulfit hinzu, dann füllt man auf mit Aqua dest. auf 180 ml. Aufsteigende Alkoholreihe, Einbetten in Caedax $n_D^{20} = 1,55$.
Herstellung des SCHIFFschen Reagenz (MÜLLER,20):
0,5 g Pararosanilin in 15 ml nHCl ohne Erwärmen lösen; 0,5 g Kaliummtabisulfit ($K_2S_2O_2$) in 85 ml Aqua dest. lösen und zusetzen; nach 24 Stunden filtrieren. Aufbewahren der Präparate im Dunkeln.

2. Zytophotometrie

Zytophotometrie mit dem automatisch registrierenden Zytophotometer UMSP I der Firma Carl Zeiss, Oberkochen. Meßbedingungen: Wellenlänge 560 my, Leuchtfeldblende 2 my in Objektebene. Objektiv 100fach, NA 1,25 , Glyzerinimmersion. Multiplierblende entsprechend 1 my im Präparat. Verstärkerstufe 1, Dämpfungsstufe 1 (0-100% etwa eine Sekunde), Objektvorschub 40 my pro Minute.Zeilenabstand bei der mäanderförmigen Abrasterung 1 my, bei kleineren Zellen 1/2 my, Multiplierblende dann 1/2 my.

3. Karyometrie

Karyometrie der photometrisch untersuchten Zelle mit einem Okularschraubenmikrometer in Anlehnung an die von LEIBETSEDER (2) zur Kerngrößenklassenbestimmung der Erythroblasten verwandten Methode. WILFINGSEDER (21) gibt zur Genauigkeit der Messung die Größenordnung von 0,5 bis 0,25 my an.
Aufgrund der methodenkritischen Prüfungen über Knochenmarksausstriche von RUHRMANN (9) und seinen Bedenken gegen die Errechnung von Kernvolumina aus Durchmessern von Ausstrichpräparaten werden lediglich die gemessenen Durchmesser mitgeteilt.
In jedem Präparat bestimmten wir in der Regel an 200 Zellen den Kerndurchmesser und den dazugehörigen relativen DNS-Gehalt. Es wurde jedes Präparat in regelmäßiger Form ohne Bevorzugung bestimmter Zonen quer durchmustert, dabei fand jede frei und einzeln liegende, klar zu differenzierende rote Zelle Berücksichtigung, wenn sie nicht beschädigt war und einen annähernd runden Kern besaß.

IV. F A L L B E S P R E C H U N G

Ge.,Johann, 63 Jahre. Aufnahme zur Einstellung eines Diabetes, der seit dem 56. Lebensjahr bekannt ist. Wegen ungeklärter Oberbauchbeschwerden und Gewichtsabnahme wurde eine Laparoskopie durchgeführt und dabei Lebermetastasen eines unbekannten Primärtumors festgestellt. in den letzten Wochen vor der Sternalpunktion erhielt der Patient keine Medikamente, früher Vit.-B Präparate zur Lebertherapie.
Blutbilder aus den Jahren 1957, 1961 und am Tage vor der Sternalpunktion 1965 waren unauffällig:

	1957	1961	4.8.1965
Hb in g%	16,8	16,0	14,4
Ery in Mio/ml	4,49	4,66	4,70
HbE	37,3	34,3	30,6
Durchmesser	-	-	7,4
Retikulozyten %	-	-	13,0
Leukozyten	7 150	6 100	9 400
Thrombozyten	-	-	121 000
Stabförmige	1	1	3
Segmentkernige	45	48	76
Eosinophile	4	5	-
Basophile	5	-	-
Lymphozyten	43	41	18
Monozyten	2	5	3

Am Tag vor der Sternalpunktion (3.8.1965):

HK	49	%	LDH	195 E
Eisenspiegel	118	Gamma	GOT	17 E
Kalium	5,5	mval	GPT	11 E
Phosphor	1,7	mval	Alk.Phosphatase	92 E
Harnstoff	38	mg%		
Harnsäure	3,1	mg%	Quick-Test	60 %
Kreatinin	1,0	mg%	Retraktionszeit	2,1 5,5 7,7
Bromthalein	1,3	mg%	Blutungszeit	3 min 30 sec
Cholesterin	157	mg%	Gerinnungszeit	5 min

Sternalpunktion am 5.8. 1965

209 000 kernhaltige Zellen; Markstatus: R/W = 32/100
erythropoetische Reifungszahl 175
Sideroblasten (100 rote Vorstufen) 35% positiv

Proerythroblasten		2		Myeloblasten	-
	jug.	3		Promyelozyten	2,5
Erythroblasten	gew.	6		Myelozyten	17
	alte	33		Jugendliche	21
				Stabkernige	28,5
	jug.	4		Segmentkernige	31
Normoblasten	gew.	40		Übersegmentkernige	-
	alte	12			
Monoblasten		-		Retikulumzellen	
Monozyten		1		gew.	1
	jug.	-		-blast	0,5
Lymphozyten	gew.	16,5		Phagen	1
	alte	-		Plasmazellen	1

Granulopoetische Zellen / Gesamt-Weiße 79 / 100
granulopoetische Reifungszahl 232

V. E R G E B N I S S E

An feulgengefärbten Sternalmarkausstrichen ist eine Einteilung kernhaltiger roter Vorstufen aufgrund der Zytoplasmaeigenschaften nicht möglich, da es nur zu einer Anfärbung der Zellkerne kommt. Deshalb werden alle Ergebnisse der feulgenphotometrischen DNS-Untersuchung auf die gleichzeitig mitbestimmte Kerngröße bezogen und die roten Vorstufen generell nur als Erythroblasten bezeichnet.

Anstelle des Zellkernvolumens wurde der Kerndurchmesser als Repräsentant der Kerngröße eingesetzt; denn an Ausstrichpräparaten mit flach ausgebreiteten Zellen stellt die unbekannte Zelldicke für Kernvolumenberechnungen eine große Fehlerquelle dar.(RUHRMANN,9).

Abbildung 1 gibt die Meßwerte der Kerndurchmesserbestimmung an allen untersuchten 5000 Erythroblasten wieder.Auf der Abszisse sind die Meßwerte der Zellkerndurchmesser in my aufgetragen, die Ordinate gibt die jeweilige Anzahl der Zellkerne in Prozent an.
Es treten mehrere Maxima auf, deren Gipfelhöhe von den kleinen Durchmessern zu den großen abnimmt. Maxima lassen sich bei den Durchmessern 4,4 my, 5,4 my, 6,2 my und 7,2 my ablesen. Bei den größeren Durchmessern erlaubt die geringe Zellzahl keine sichere Zuordnung von Maxima zu bestimmten Durchmessern.
Das absolute Maximum in der graphischen Darstellung unserer Messungen dürfte dem Verteilungsmaximum der $K_{1/8}$-Erythroblasten der Nomenklatur (LEIBETSEDER,WEICKER) entsprechen. Diese Normoblastenkerne weisen in unseren Ausstrichpräparaten einen Durchmesser von 4,4 my auf.

Das dem Häufigkeitsgipfel der $K_{1/4}$-Erythroblasten entsprechende Maximum liegt in unserer Darstellung bei 5,4 my. $K_{1/2}$-Erythroblasten sind in größter Häufigkeit um 6,2 my und K_1-Erythroblasten um 7,2 my anzutreffen.

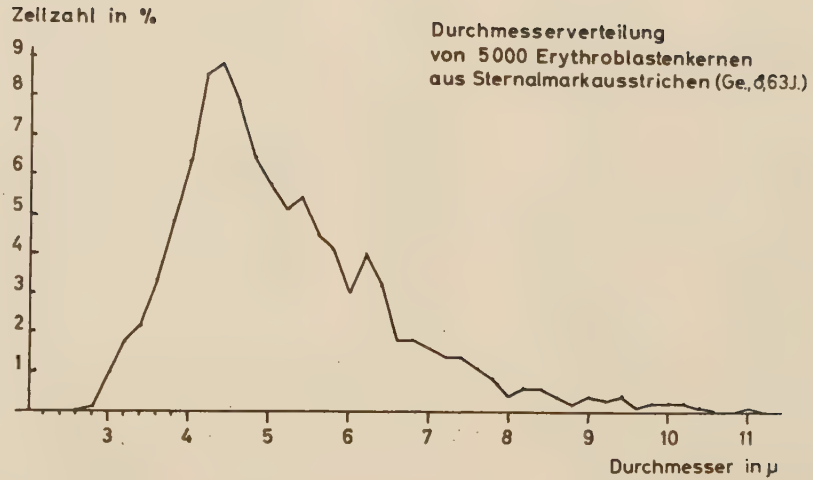

Abb. 1 zeigt die Durchmesserverteilung von 5000 Erythroblastenkernen aus Sternalmarkausstrichen eines gesunden Erwachsenen

Die Erythroblasten mit noch größeren Durchmessern häufen sich in unseren Ausstrichpräparaten nicht um einen eindeutig bestimmbaren Verteilungsgipfel. Diese großen Erythroblasten unterliegen aber auch den stärksten Veränderungen durch die Verformungskräfte unter Ausstrichbedingungen, so daß hier - auch unter zusätzlicher Berücksichtigung der geringen Anzahl - von vornherein kein sehr deutlich ausgeprägter Gipfel erwartet werden konnte.

Bei den kleinsten Kernen deutet sich eine Häufung um 3,2 my an. Ob diese Zellkerne $K_{1/16}$-Erythroblasten zuzuordnen sind, muß offen gelassen werden.

Abbildung 2 zeigt die prozentuale Verteilung des relativen DNS-Gehaltes aller 5000 gemessenen Zellkerne. Die Abszisse gibt den relativen DNS-Gehalt in Arbeitseinheiten (AE) an, die Ordinate die Zellkernanzahl in Prozent.

Auffallend ist der Befund, daß etwa 2/3 aller Erythroblastenkerne in sehr engen Grenzen schwankende DNS-Absorptionswerte um 35 AE haben. Das restliche Drittel der Zellkerne weist DNS-Werte in breiter Streuung auf. Oberhalb von 86 AE finden sich nur 8 Zellkerne mit relativen DNS-Werten von 87 (2mal), 89, 90, 92, 93, 96 und 97 AE.
Nur 10 Zellkerne haben einen relativen DNS-Gehalt unter 20 AE. Diese Zellkerne sind zugleich sehr klein und haben relative Werte von 19 (6 Kerne), 17, 15(2 Kerne) und 14 AE.
Noch kleinere feulgenpositive Kerne konnten nirgendwo - auch nicht freiliegend - in den Präparaten beobachtet werden.

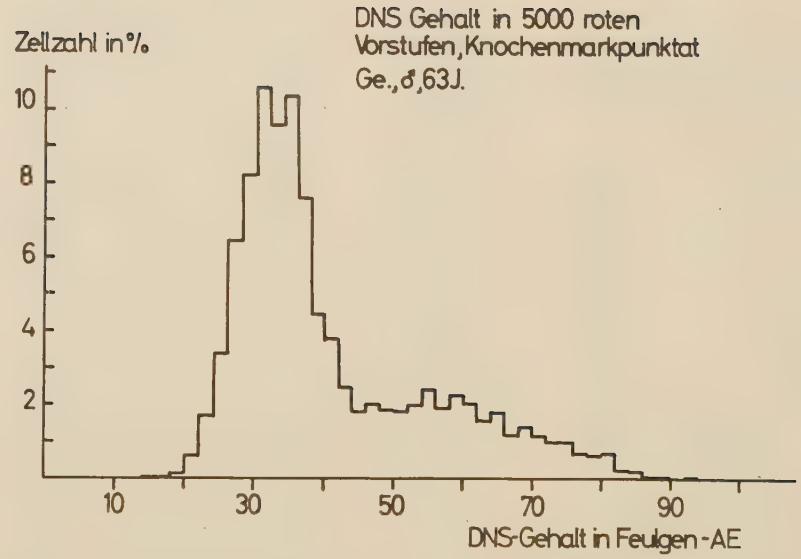

Abb. 2 zeigt die prozentuale Verteilung des relativen DNS-Gehaltes von 5000 kernhaltigen Vorstufen roter Blutkörperchen

Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung der entscheidenden Meßwerte. Darin werden die gegenseitigen Beziehungen des Durchmessers und des relativen DNS-Gehaltes in allen einzelnen Zellkernen dargestellt. Es wird einem jeden durch den Durchmesser charakterisierten Erythroblastenkern der bei der Messung gleichzeitig bestimmte DNS-Absorptionswert in relativen AE zugeordnet. Auf der Abszisse ist der Kerndurchmesser abgetragen, die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in AE an.

Im Sinne der dieser Untersuchung zugrunde liegenden Fragestellung kann aus dieser graphischen Darstellung (Abb.3) abgelesen werden:

1) daß die DNS-Werte in den Zellkernen einer beliebig auswählbaren Erythroblastengröße nicht gleich groß sind, sondern großen Schwankungen ausgesetzt sind,

2) daß der gleiche relative DNS-Gehalt in sehr vielen Erythroblasten anzutreffen ist, die ganz unterschiedlich große Durchmesser haben,

3) wie groß der Unterschied zwischen geringstem und höchstem DNS-Gehalt bei gleich großen Zellkerndurchmessern ist, und

4) wie sämtliche Erythroblasten der untersuchten Population eines hämatologisch Gesunden sich bezüglich ihres Kerndurchmessers und ihres relativen DNS-Gehaltes verhalten.

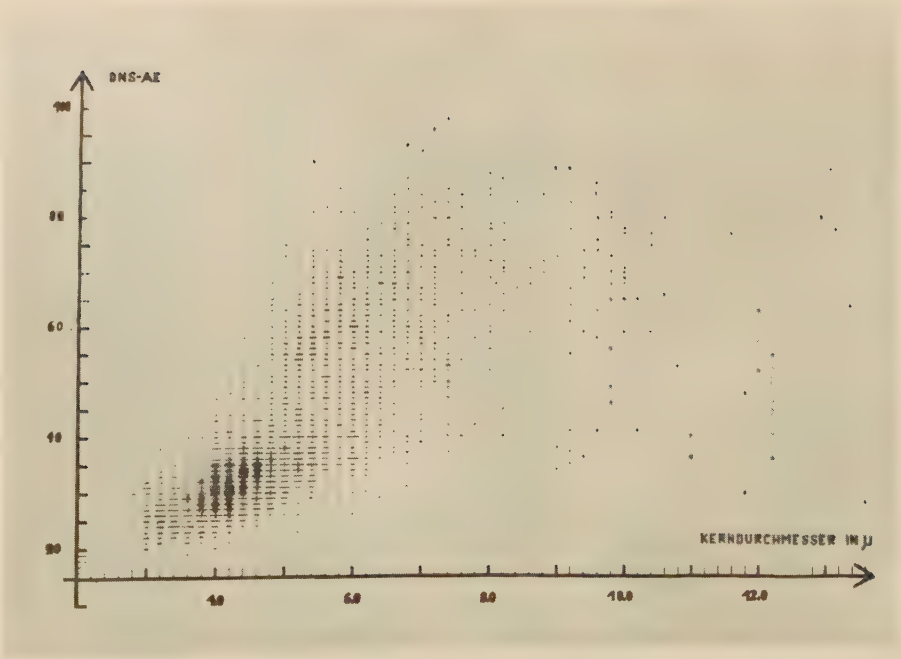

Abb. 3 zeigt die Zuordnung des relativen DNS-Gehaltes zum Zellkerndurchmesser von 5000 Erythroblasten aus dem Sternalmark eines gesunden Erwachsenen

VI. D I S K U S S I O N

An den Erkenntnissen über Erythroblastenteilungen und an dem Verhalten von Somazellen bezüglich ihres DNS-Gehaltes sollen unsere experimentell ermittelten Befunde überprüft werden.

1. In seinem Modell der Erythropoese leitet WEICKER aus Kerngrößenmengen die Halbierungsteilung (Sukzedanteilung) als den Teilungsmodus der Erythroblasten ab. Die verschiedenen kernhaltigen Vorstufen roter Blutkörperchen gehen nach WEICKER dadurch auseinander hervor, daß die Erythroblasten ihr Volumen schrittweise halbieren. "Die Erythroblasten durchlaufen bezüglich ihrer Kernmasse drei Sukzedanteilungen, d.h. sie halbieren, vierteln und achteln ihr Volumen."(7). Und: "Die Tochterzellen eines Sukzedanteilungsaktes verbleiben während ihrer Lebensspanne (Generationszeit, Interphase) auf dem Status des halben Volumens ihrer Mutterzelle." WEICKER hält es ebenso für möglich, "daß die DNS-Menge halbiert bleibt - wie das Kernvolumen auch" (7). Seine Beobachtung von Hypoploidie (Chromosomenreduktion) "spricht gegen eine Teilungsauslösung durch vorherige Verdopplung der DNS-Menge" (17). Auch ROHR (10) nimmt deshalb an, daß die Chromosomenzahl bis auf die haploide Zahl abfallen kann.
Demnach müßte man in der Erythropoese 8n-,4n-,2n- und 1n-DNS-Werte antreffen. Diese DNS-Werte währen den einzelnen eingangs erwähnten verschiedenen Kerngrößenklassen zuzuordnen.

. 2. Auf der anderen Seite ist der DNS-Gehalt in Zellkernen aller Somazellen mit indirektem Kernteilungsmodus konstant. Die DNS gehören zum festen genetischen Bestand der normalen diploiden Somazellen (MIRSKY,11). Beim Menschen wurde der DNS-Gehalt in normalen, ruhenden diploiden Somazellen mit 6×10^{-12}g bestimmt (MÜLLER,SANDRITTER,12).

Erst vor der Teilung verdoppelt sich die DNS-Menge. Die zur Verdopplung der Chromosomen führende Vermehrung ihrer Elementarsubstanz, der DNS, ist unumgängliche Voraussetzung jeder indirekten Kernteilung. Nach ALTMANN (13) geht diese Vermehrung ausschließlich im Stadium des von uns untersuchten Ruhekerns (Interkinesekern) vor sich. Mitosen werden in der Erythropoese in morphologischen Untersuchungen bei allen kernhaltigen Vorstufen beobachtet und gezählt (z.B. WEICKER,18).

Nach diesen Vorstellungen verhält sich der DNS-Gehalt in Somazellen mit indirektem Kernteilungsmodus wie folgt: (vgl. Abb.4) nach der postmitotischen Ruhephase G_1 mit einem DNS-Gehalt vom diploiden Wert (2n) steigt dieser in der folgenden DNS-Synthesephase S bis auf doppelte DNS-Werte (4n) in der prämitotischen Ruhephase G_2 an. Durch die folgende indirekte Zellteilung wird die zuvor auf den doppelten DNS-Wert angewachsene DNS-Menge halbiert und erlangt wieder den diploiden Ausgangswert.

3. An diesen grundsätzlichen Erwägungen sind unsere experimentell ermittelten Befunde des DNS-Gehaltes in Erythroblasten zu überprüfen.

a) Unsere Meßwerte des relativen DNS-Gehaltes (Abb.2) zeigen, daß in den Erythroblasten aller Größen der überwiegende Teil aller Zellkerne einen relativen DNS-Gehalt von 30 AE hat. Die meistenZellkerne aller Durchmesser und somit aller Erythroblastenreifungsstufen weisen diesen nur in engen Grenzen schwankenden DNS-Gehalt auf. Andere Häufungsmaxima des relativen DNS-Gehaltes der restlichen Erythroblasten lassen sich aus Abb.2 nicht ablesen. Wenn man von Extremwerten absieht, ändern sich die DNS-Werte nur in einem Verhältnis von 1:2 (etwa 30:60), nicht aber in dem von 1:2:4:8, wie bei schrittweiser Halbierung des DNS-Gehaltes nach WEICKERs Überlegungen zu vermuten wäre.

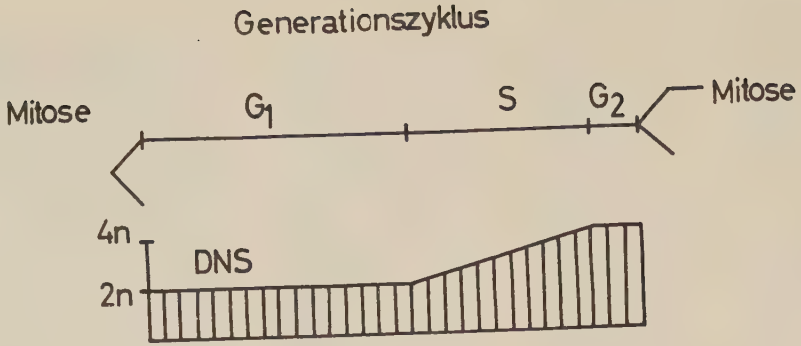

Abb. 4: Schematische Darstellung des Generationszyklus zwischen zwei Mitosen.
G_1= postmitotische Ruhephase, der DNS-Gehalt des Zellkerns ist diploid (2n)
S = DNS-Synthesephase, der DNS-Gehalt steigt an
G_2= prämitotische Ruhephase mit verdoppeltem DNS-Gehalt (4n).

b) Da wir unter Berücksichtigung der methodenkritischen Untersuchung von RUHRMANN (9) über die Errechnung von Kernvolumina aus den in Blutausstrichen ermittelten Kerndurchmessern auf die Bildung von Kernregelklassen, welche WEICKERs Häufungsbildern zugrunde liegen, verzichtet haben, stimmen unsere Kernhäufungen nur nach der Anzahl der Maxima mit den von WEICKER et al. ermittelten Häufungen überein.

c) Die überwiegende Mehrzahl aller Zellkerne weist unabhängig von der Größe des Kerndurchmessers den relativ konstanten DNS-Wert von 30-35 AE auf; es sind etwa 2/3 aller untersuchten Zellkerne. Unter identischen Versuchsbedingungen vorgenommene Messungen von MÜLLER (14) an diploiden Lymphozyten ergaben für diese einen untereinander sehr gleichmäßigen DNS-Gehalt von 33,6 AE, sodaß wir für Erythroblasten mit DNS-Absorptionswerten in derselben Größenordnung diploide (2n) Zellen bzw. Zellkerne annehmen dürfen.
25% der kernhaltigen Vorstufen der roten Blutkörper besitzen in der vorliegenden Untersuchung an der menschlichen Erythropoese einen sicher erhöhten DNS-Gehalt (über 40 AE).

Da unsere Befunde des DNS-Gehaltes nicht dem Verhältnis 1:2:4:8 und damit nicht den Überlegungen WEICKERs zur Sukzedanteilung mit jeweiliger Halbierung des DNS-Gehaltes entsprechen, müssen wir für die kernhaltigen Vorstufen roter Blutkörperchen annehmen, daß sich diese bezüglich ihres DNS-Gehaltes wie andere Somazellen verhalten und eine Phase durchlaufen, in der sie ihren DNS-Gehalt verdoppeln. Sie verändern ihren DNS-Gehalt gemäß den in Abb.4 dargestellten Verhältnissen.

Die Übereinstimmung der Anzahl der Häufungen in der Kerndurchmesserverteilung (Abb.1) mit der WEICKERs und anderer Autoren bedeutet keine Einschränkung dieses Widerspruchs, da zur Ermittlung der Kerndurchmesserverteilung lediglich die lineare Ausdehnung der Zellkerne und ihre Anzahl Berücksichtigung findet, nicht aber der von uns gleichzeitig bestimmte relative DNS-Gehalt in demselben Zellkern. Die alleinige Messung des Kerndurchmessers erlaubt allein einen Blick in die numerische Verhaltensweise der Vorstufen roter Blutkörperchen, während die zusätzliche Bestimmung des DNS-Gehaltes in denselben Zellkernen eine Betrachtung der quantitativen Veränderungen der DNS-Beladung ermöglicht und somit eine zusätzliche Möglichkeit zur Differenzierung der Erythroblasten bietet.

d) Unter Berücksichtigung des Befundes, daß die Erythroblasten sich bezüglich ihres DNS-Gehaltes wie andere Somazellen verhalten und daß auch sie ihn in einer DNS-Synthesephase vor jeder Mitose verdoppeln, läßt sich nach Aufschlüsselung der Erythroblastenkerne in ruhende (d.h. postmitotisch ruhende) mit konstantem DNS-Gehalt und in DNS-synthetisierende Kerne ein den wahren Verhältnissen getreueres Bild darstellen (Abb.5):
Nehmen wir an, daß die Zellkerne mit einem DNS-Gehalt unter 40 relativen DNS-AE als zu den in Ruhe befindlichen und die über 40 AE zu den DNS-synthetisierenden und somit den DNS-Gehalt verdoppelnden Kernen gehören, so können wir folgende der veränderten Betrachtung angepaßte graphische Darstellung wiedergeben (Abb.5):
In dieser Abbildung sind die DNS-synthetisierenden Erythroblastenkerne außerdem nach ihrem ansteigenden DNS-Gehalt (willkürlich 4mal) unterteilt (-47 AE,-54 AE,-63 AE und über 64 AE). Einander entsprechende Verteilungsmaxima bei den DNS-synthetisierenden (s) Erythroblastenkernen verschieben sich mit wachsendem DNS-Gehalt immer mehr in Richtung des größeren Durchmessers. Mit wachsendem DNS-Gehalt nimmt offensichtlich der Kerndurchmesser zu.

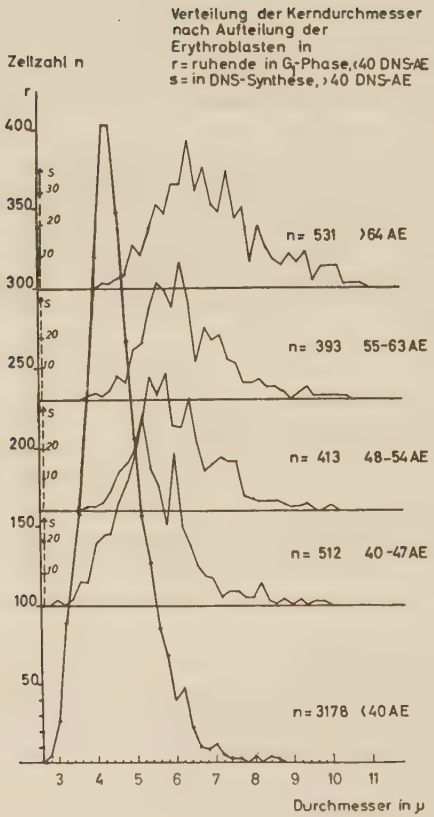

Abb.5: Kerndurchmesserverteilung von 5027 Erythroblasten eines gesunden Erwachsenen aus Sternalmarkausstrichen nach Aufteilung der Erythroblasten in r= ruhende in G_1-Phase, unter 40 DNS-AE und s= in DNS-Synthese, über 40 DNS-AE

Eine Größenzunahme der Erythroblastenkerne widerspricht vollkommen der Vorstellung der Volumenkonstanz, nach der die Tochterzellen eines Sukzedanteilungsaktes auf dem Status des halben Volumens der Mutterzelle verbleiben sollen. Wenn die Erythroblasten nach jeder Kernteilung als Vorbereitung auf die folgende Teilung ihren DNS-Gehalt wieder verdoppeln und dabei eine Kerngrößenzunahme erfahren, müssen bei der Kernregelklassenbildung in einer Größenklasse zwangsläufig Erythroblasten unterschiedlicher Entwicklungsstufen enthalten sein, z.B. $K_{1/2}$-Erythroblasten nach Größenzunahme während der DNS-Synthese und "ruhende" K_1-Erythroblasten mit diploidem DNS-Gehalt. Zwar sind dann in dieser Kerngrößenklasse gleich große Kerne enthalten, nicht aber Erythroblasten gleicher Entwicklungsstufe! Diese Erkenntnis läßt sich am Beispiel einer willkürlich herausgegriffenen Kerngrößenhäufung (5,4 my) veranschaulichen (Abb.6).

Alle Erythroblasten besitzen den gleich großen Kerndurchmesser von 5,4 my. Die zu diesen gleich großen Erythroblastenkernen ermittelten DNS-Mengen sind aber keineswegs gleich groß. Sie unterliegen vielmehr denselben Schwankungen wie sie für die Erythroblasten aller Kerngrößen gemessen wurden (vgl. Abb.2). Ein Teil dieser gleich großen Erythroblasten besitzt die einem diploiden DNS-Gehalt entsprechende DNS-Beladung, während der andere Teil einen erhöhten DNS-Gehalt aufweist, wie er in Zellkernen mit Teilungsvorbereitung anzutreffen ist.

Es ist also in dieser Erythroblastengrößenhäufung (5,4 my) nicht eine einheitliche Erythroblastengeneration zusammengefaßt. Die verschiedenen DNS-Mengen in Erythroblasten eines Durchmessers werden nur verständlich, wenn man berücksichtigt, daß in den Zellkernen nach der Teilung eine erneute Vermehrung der Substanz der Chromosomen und damit auch Vermehrung der DNS als Vorbereitung zur nächsten Teilung erfolgt. Die erhöhten DNS-Werte sind Ausdruck der Syntheseleistung der Zellkerne.

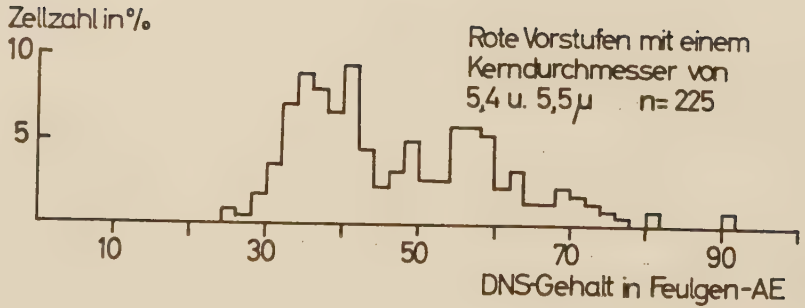

Abb. 6 zeigt Erythroblasten einer Größe (Kerndurchmesser 5,4 bis 5,5 my) mit zugehöriger DNS-Beladung

e) In einzelnen kleinen Zellkernen bestimmten wir einen DNS-Gehalt unter 2n-Werten. Den verminderten DNS-Gehalt möchten wir auf den DNS-Verlust vor der Kernausstoßung zurückführen. Diese kleinen Zellkerne erleben keine DNS-Synthesephase mehr.

f) Der Befund einer DNS-Synthese in Erythroblasten aufgrund unserer quantitativen Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes im einzelnen Zellkern mithilfe der mikrospektrophotometrischen Methode entspricht den Ergebnissen, die durch Autoradiographie erhoben wurden. Durch den Einbau radioaktiv markierten ^{3}H-Thymidins in den Zellkern und anschließender Autoradiographie wurde eine DNS-Synthese in Erythroblasten bewiesen. Die Erkenntnis einer DNS-Syntheseleistung in Erythroblasten aufgrund autoradiographischer Befunde findet Ausdruck in den Darstellungen von LAJTHA (15) und ALPEN et al. (16); Abb. 7 und 8 :
LAJTHAs Darstellung vermittelt, daß der DNS-Gehalt von diploiden Werten (2n) auf verdoppelte (4n) während einer 11 Stunden dauernden Syntheseperiode ansteigt.
ALPEN et al. ordnen in ihrem Schema der normalen Erythroblastenteilungen den Erythroblasten ebenfalls jeweils diploide (2n) und verdoppelte (4n) Werte zu.

Übersetzung der Legenden

Abb.7: Schema des Zellzyklus, die DNS-,RNS-,Protein- und Hb-Synthese betreffend.2N-4N= diploides u. tetraploides Stadium; ausgezogene Kurve=DNS-Synthese (G_1=postmitotische und G_2=prämitotische Ruhephase, S= Syntheseperiode); unterbrochene Kurve= RNS-,Protein- oder Hb-Synthese. (Beachte,daß diese keine lineare Kurve sondern eine Exponentialkurve ist.)

Abb.8: Schematische Darstellung der normalen (oben)u. der terminalen Erythroblastenteilung.In der normalen Teilung (oben) ist die Zellenlinie durch das Ausbleiben der Differenzierung einer Tochterzelle unterbrochen; während im Schema der terminalen Teilung der Erythroblast verloren geht.

Abb. 7 und 8

L. G. LAJTHA AND R. OLIVER A MODEL OF THE ERYTHRON

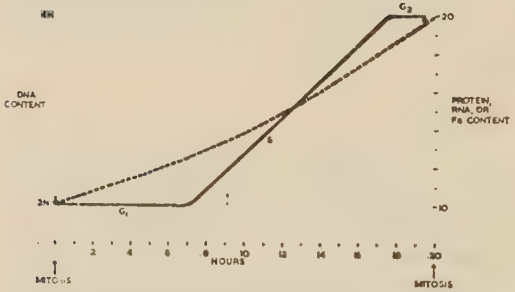

FIG. 2. Scheme of cell cycle in respect of DNA, RNA, protein and Hb synthesis. 2N–4N = diploid and tetraploid stage; Solid line = DNA synthesis (G_1 = first gap, S = period of synthesis, G_2 = second gap); Interrupted line = RNA, protein or Hb synthesis. (Note that this line is not straight, but an exponential curve.)

E. ALPEN AND D. CRANMORE
CELLULAR DYNAMICS AND REGULATION OF ERYTHROPOIESIS

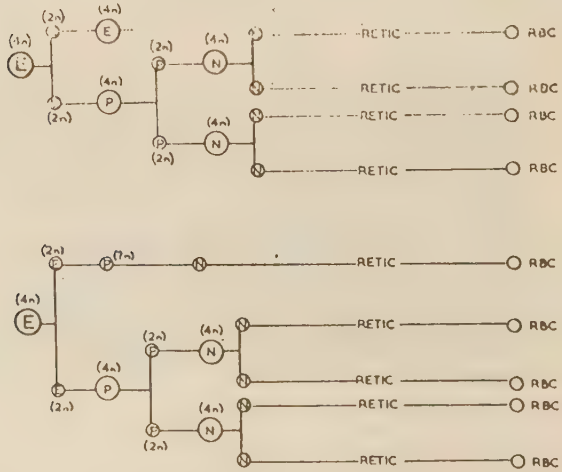

FIG. 3. Schematic representation of normal *(top)* and terminal erythroblast division. In the normal division the cell line is sustained by the nondifferentiation of one daughter cell, while in the terminal scheme the erythroblast is lo t

Zusammenfassend sei gesagt, daß die Deutung unseres Befundes eines erhöhten DNS-Gehaltes in einem Teil der untersuchten Erythroblasten als DNS-Syntheseleistung in Übereinstimmung steht mit den Ergebnissen einer gänzlich anderen Methode, der Autoradiographie, und daß diese Deutung auch den allgemeinen Vorstellungen über den DNS-Gehalt in Somazellen entspricht. Wir haben in allen Erythroblastengrößenordnungen neben Kernen mit konstantem DNS-Gehalt solche mit einem erhöhten Gehalt gefunden. Daraus lesen wir ab, daß die DNS-Mengen in Erythroblasten nicht den Vermutungen WEICKERs entsprechen und nach jeder Teilung weder auf dem Status des halben Volumens noch der halbierten DNS-Menge stehen bleiben. Die Erythroblasten erfahren vielmehr eine DNS-Synthesephase mit Größenzunahme des Zellkerns.

WEICKER nahm die Existenz von Reifeteilungen in der Erythropoese an und schloß daraus, daß rote Vorstufen mit kleinen Zellkernen reifer als solche mit großen Zellkernen seien. Die Annahme, daß die Kerngröße ein direktes Maß der Reifung der roten Vorstufen sei, wird von den meisten Hämatologen gemacht.

Da in der vorliegenden Arbeit -auch in Übereinstimmung mit BOLL (22),welche an Einzelzellen in der Zellkultur eine Kerngrößenzunahme im Ablauf eines Generationszyklus fand, - wahrscheinlich gemacht werden konnte, daß der DNS-Gehalt und der Kerndurchmesser während eines Generationszyklus in der Phase der DNS-Synthese zunimmt, muß die Auffassung einer alleinigen Beziehung von Kerngröße und Kernreifung eingeschränkt werden.
In den "Kernregelklassen" faßt man nicht Kerne mit einheitlichen Kriterien zusammen, sondern Zellkerne mit zwar gleichen Durchmessern aber zu unterschiedlichem Zeitpunkt ihrer DNS-Synthese. Die "Kerngrößen" allein können deshalb kein "ausgezeichnetes Kriterium für die Reifungsvorgänge in Erythroblasten darstellen"(LEIBETSEDER,2).

VII. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Es werden Untersuchungen des Durchmessers und des relativen DNS-Gehaltes im einzelnen Erythroblastenkern vorgelegt.

2. Berücksichtigt werden 5000 kernhaltige Vorstufen roter Blutkörperchen eines hämatologisch gesunden Erwachsenen aus einem Sternalpunktat.

3. An feulgengefärbten Ausstrichpräparaten wird mit dem Universalmikrospektrophotometer UMSP I (Zeiss) der relative DNS-Gehalt und mit einem Okularschraubenmikrometer der Durchmesser bestimmt.

4. Ergebnisse der Durchmesserverteilung, der DNS-Beladung und der gegenseitigen Beziehung dieser Werte werden graphisch dargestellt.

5. Etwa 2/3 aller Erythroblastenkerne besitzt wie Lymphozyten einen relativen DNS-Gehalt um 30-35 AE, 25% einen erhöhten DNS-Gehalt über 40 AE.

6. Der erhöhte DNS-Gehalt wird gedeutet als das Äquivalent der zur Chromosomenverdopplung führenden DNS-Synthese, der erniedrigte DNS-Gehalt wird den in Pyknose befindlichen Zellkernen zugeordnet. Nach ihrem DNS-Gehalt werden die Erythroblasten unterteilt in diploide (2n) mit konstanter DNS-Menge und in solche, die sich in einer DNS-Synthesephase befinden.

7. Diese Ergebnisse entsprechen nicht den Vermutungen von WEICKER über die Sukzedanteilungen mit Halbierung des DNS-Gehaltes bei den Volumenhalbierungsteilungen der Erythroblasten. Die DNS-Menge bleibt nicht halbiert.

8. Die gegebene Deutung des erhöhten DNS-Gehaltes in einem Teil der Erythroblasten als Ausdruck einer DNS-Synthese vor jeder Teilung steht in Übereinstimmung mit Erkenntnissen an gewöhnlichen Somazellen und mit neueren Ergebnissen mithilfe der Autoradiographie ^{3}H-Thymidin markierter Erythroblasten.

9. Schließlich wird wahrscheinlich gemacht, daß in Erythroblasten während der DNS-Synthesephase mit ansteigendem DNS-Gehalt der Kerndurchmesser zunimmt.
Demnach umfaßte man bei der Bildung von Kernregelklassen lediglich aufgrund der Kenntnis der Kerndurchmesser nicht Erythroblasten mit einheitlichen Kriterien, sondern Kerne in verschiedenen Phasen ihres Generationszyklus mit unterschiedlichem DNS-Gehalt.

VIII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) SCHULTEN,H.: Morphologie der normalen und pathologischen Stammzellen, der Vorstufen und der reifen Zellen
In: Hdb.ges.Hämat. 2. Aufl.
Bd.I,1 191-197
Hrg.: L.Heilmeyer und A.Hittmair
(Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, 1957)

2) LEIBETSEDER,F.: Erythropoese und Zellkerngröße
Wiener Z.inn.Med. 29 (1948),397-408

3) WEICKER,H.: Exakte Kriterien des Knochenmarks: Die Maß- und Mengenrelationen der Erythroblasten als Ausdruck der Reifungs- und Teilungsgesetze der Erythropoese
Schweiz.med.Wochenschr. 84, 245-251 (1954)

4) JAKOBJ,W.: Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdopplung ihres Volumens
Arch.Entw.mech. 106, 124-191 (1925)

5) AMBS,E.: Durchmesser und Hämoglobingehalt der Erythrozyten
Acta hämatol., Vol.15, 302-312 (1956)

6) FEULGEN,R. und H. ROSSENBECK: Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten
Z.physiol.Chem.135,203-248 (1924)

7) WEICKER,H.: Zellteilung und Zellteilungsstörungen
In: Hdb.ges.Hämat. 2. Aufl.
Bd.I,1 148-177 (1957)

9) RUHRMANN,G.: Morphologische Untersuchungen über die Erythropoese des Neugeborenen und des Säuglings
Habilitationsschrift, Med. Fak., Tübingen (1965)

10) ROHR,K.: Das menschliche Knochenmark
Georg Thieme, Stuttgart, 3. Aufl. (1960)

11) MIRSKY,A.E. and H.RIS: Quantitative Cytochemical Determination of Desoxyribonucleic Acid with Feulgen-nuclear-reaction
J.gen.Physiol. 33, 125 (1949)

12) MÜLLER,D., SANDRITTER,W. und H.G. SCHIEMER: Über den Nukleinsäuregehalt und das Trockengewicht von haploiden und diploiden Zellen
Verh. 55, Anat.Ges. Ffm. 146 (1958)

13) ALTMANN,H.W.: Allgemeine Morphologie der Zelle
In: Hdb.ges.Hämat. 2. Aufl. Bd.I,1 86 (1957)

14) MÜLLER,D.: Studium der Proliferationsdynamik von Blutzellen mit Hilfe cytophotometrischer DNS-Bestimmung in der Einzelzelle
Klin.Wschr. 44, 174 (1966)

15) LAJTHA,L.G. and G.OLIVER: Studies on the kinetics of erythropoiesis
A model of the erythron
In: Ciba Foundation Symposion on Haemopoiesis
J. & A. Churchill LTD. London (1960) 289-324

16) ALPEN,E. and D.CRANMORE: Observations on the Regulation of Erythropoiesis and on Cellular Dynamics by Fe^{59} Autoradiography
In: The kinetics of cellular proliferation
Grune & Stratton, New York 289-324 (1959)

17) WEICKER,H. und K.H. TERWEY: Die Chromosomenzahl der Erythroblasten
Klin.Wschr. 36, 1132 (1958)

18) WEICKER,H.: Die Erythroblastenmitosen. Mitosedauer und Phasenverlauf der hemihomoplastischen Karyokinese des Proerythroblasten und der drei Erythroblasten-Reifeteilungen
Zschr.klin.Med. 151, 407-428 (1954)

19) LEUCHTENBERGER,C.: Quantitative Determination of DNA in Cells by Feulgen Microspectrophotometry
In: General Cytochemical Methods I 219-230 (1958)
Edited by I.F. Danielli
Academic Press Inc., Publishers

20) MÜLLER,D.: Erfahrungen mit der Feulgenfärbung für quantitative cytochemische DNS-Untersuchungen
Histochemie 7, 96-102 (1966)

21) WILFINGSEDER,P.: Karyometrik
Mikroskopie 3, 243-250 (1948)

22) BOLL,I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro
Blut 11, 326-344 (1965)

Herrn Professor Dr. H. E. BOCK danke ich für die Überlassung des Themas.
Für die Unterstützung bei der Ausarbeitung schulde ich Herrn Privatdozent Dr. D. MÜLLER Dank.

L E B E N S L A U F

Am 2. Oktober 1940 wurde ich, Hans-Georg Pouillon, als Sohn des landwirtschaftlichen Beamten Georg Pouillon und seiner Ehefrau Annelise, geb. Lüders, in Klosterhof im Lande Brandenburg geboren.

Von 1947 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Kremkau/ Altmark, bis 1955 das Humanistische Gymnasium in Viersen. 1956 wechselte ich an das Naturwissenschaftliche Gymnasium Schwertstraße nach Solingen und bestand dort am 28. Februar 1962 die Reifeprüfung.

Vom Sommersemester 1962 bis zum Wintersemester 1964 studierte ich Medizin an der Universität in Köln. Ab Sommersemester 1965 setzte ich mein Medizinstudium in Tübingen fort und legte dort am 31. Juli 1968 das Medizinische Staatsexamen ab.